

機関番号：3 2 4 0 9

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 1 1 9 1

研究課題名(和文) 難治性喘息の気道炎症病態の解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of airway inflammation in refractory asthma.

研究代表者

永田 真(NAGATA MAKOTO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：2 0 2 1 1 4 4 3

研究成果の概要(和文):

難治性喘息では、好酸球性炎症だけでなく、好中球性炎症が重要な役割を果たすことが知られている。我々は以前、経口ステロイドに依存性の難治性喘息では、誘発喀痰中に好中球数が増加し、これが好酸球集積と相関性を示すことを報告した。さらに、好中球と好酸球の共存下に IL-8 で好中球基底膜通過反応を誘導すると、好酸球刺激因子がなくても、好酸球の基底膜通過遊走反応が誘導され、好中球が好酸球の組織集積を能動的に調節しうることを報告した。本研究においては、さらに難治性喘息における気道炎症病態の解析をすすめ、以下の知見を得た。

重症喘息患者の喀痰では IL-8 が選択的に発現亢進している。呼気凝縮液では、重症またはコントロール不良例で TXB2 または LTB4 の発現亢進が見られる。IFN 群は血管内皮細胞における接着因子の発現亢進を介して好酸球の接着能を亢進させる。代表的吸入 2 刺激薬である salbutamol は喘息患者単核球からの IL-13 産生を亢進させ、IFN- 産生を抑制する。IP-10 などの CXCR3 ligands は直接に好酸球の接着反応及び活性酸素産生を亢進させる。これらの事象が、重症喘息の病態形成において重要な役割を果たすと考えられた。

研究成果の概要(英文):

In the pathogenesis of severe asthma, not only eosinophils but also neutrophils play important roles. We previously reported a positive correlation between the concentrations of neutrophils and eosinophils in induced sputum from patients with severe, corticosteroid-dependent asthma. Furthermore, we reported that, even in the absence of chemoattractant for eosinophils, neutrophils stimulated by IL-8 are capable of inducing the trans-basement membrane migration of eosinophils, suggesting that IL-8-stimulated neutrophils lead eosinophils to accumulate in the airways of asthmatic patients. In this study, we further elucidated the pathogenesis of airway inflammation in refractory asthma. We found that concentrations of IL-8 in induced sputa are higher in severe asthmatics than in mild asthmatics. Further, concentrations of TXB2 or LTB4 in EBC also increased in unstable or severe asthma. IFNs augment eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. Salbutamol increases IL-13 and decreases IFN- production by mononuclear cells from allergic asthmatics. Finally, CXCR3 ligands including IP-10 increase adhesiveness and superoxide anion production of eosinophils. These findings are thought to play important roles in the pathogenesis of severe asthma.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・
膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

難治性喘息の気道では、しばしば好中球性炎症ならびにステロイド抵抗性の好酸球性炎症が同時に発動しており、この複雑な炎症病態が治療抵抗性に寄与すると推測される。我々は、日本人の喘息症例で経口ステロイドに依存性の難治性喘息では、誘発喀痰中に好中球数が増加し、これが好酸球集積と相関性を示すこと、誘発喀痰中の好中球集積が喀痰中 TNF- α 濃度と相関性を示すことを報告した。好中球集積機序や好中球が直接的に喘息症状を誘導しているかについては、今まで詳細には検討されてこなかった。好中球は様々な炎症分子の放出を介して、好酸球を含むアレルギー炎症に対して調節作用を発揮している可能性が考えられる。我々は最近、*in vitro* での好中球と好酸球の共存条件で、好中球遊走因子である IL-8 により好中球基底膜通過反応を誘導させると、好酸球刺激因子が全く存在しない状況においても、好酸球の著明な基底膜通過遊走反応が連動して誘導され、これが好中球由来の LTB₄ や MMP-9 を介することを観察した。逆に好酸球基底膜通過遊走反応を選択的に誘導しても、好中球の基底膜通過は発現しないことを確認した。これらの事象は、難治性喘息気道の炎症病態の機序として、好中球が一定の条件下で、好酸球の組織集積を能動的に調節しうることを示唆する。難治性喘息の気道炎症の免疫学的機序がさらに解明されれば、この病態の治療標的が見出され、炎症制御に寄与できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では難治性喘息患者の誘発喀痰と呼吸凝縮液、ならびに *in vitro* での好中球・好酸球の組織浸潤・活性化実験システムなどを用い、難治性喘息気道の炎症の分子病態の解明を進展させる事を目的とした。

(1) 誘発喀痰・呼吸凝縮液の解析

健康人、非難治性喘息、難治性喘息患者において、誘発喀痰・呼吸凝縮液の採取を行い、それぞれにおけるサイトカイン・ケモカインの発現を検討した。また重症喘息患者では吸入ステロイド治療が十分に奏功していないことから、その機序を明らかにする目的で、吸入ステロイド薬を中止可能な喘息患者、すなわち治療中止を希望する長期寛解患者において、その中止前後で誘発喀痰を採取し、

喀痰における細胞分画やサイトカイン・ケモカインの発現を比較検討した。

(2) IFN- γ 群の血管内皮細胞を介した好酸球接着に対する影響

重症喘息患者の気道では、IFN- γ 群の発現が亢進していることが報告されている。今回は IFN- γ 群の好酸球に対する直接効果及び、血管内皮細胞を介した好酸球接着に対する効果について検討した。

(3) 2 刺激薬の末梢血単核球からのサイトカイン産生に与える影響

治療薬が喘息難治化に寄与しうるかを検討する目的で、過剰使用が喘息死などと連関することが指摘されている吸入 2 刺激薬 (salbutamol) の末梢血単核球からの炎症性サイトカイン産生に及ぼす効果を検討した。

(4) CXCR3 ligands の好酸球機能に与える影響
重症喘息患者では、Th1 サイトカインである IFN- γ の発現が亢進しており、Th1 細胞の遊走因子である CXC ケモカインである CXCR3 ligands (IP-10, Mig, I-TAC) の発現も亢進していることが考えられる。好酸球には CXCR3 が発現しており、IP-10 などの CXCR3 ligands は、好酸球を直接活性化する可能性がある。今回は、CXCR3 ligands の好酸球接着反応及び活性酸素産生に対する効果について検討した。

3. 研究の方法

(1) 誘発喀痰・呼吸凝縮液の解析

難治性喘息は、ATS Workshop 2000 における refractory asthma で、定義した。また、喀痰は、以前に報告した方法に従って採取した。はじめに、唾液混入を最小限とするためにうがいを行い、salbutamol を吸入した。その後、超音波ネブライザーを用いて 4.5% 生理食塩水吸入を行い、5 分間隔で合計 30 分間、痰の喀出を行った。得られた喀痰は、1% DTT 含有 HBSS を加え、全体が均一になるまで攪拌し、HBSS 5ml で希釈後、遠心し、上清を保存した。呼吸凝縮液は、EcoScreen (Jaeger, Hochberg, Germany) を用いて、ノーズクリップ着用下に 15 分の安静呼吸を行い、呼吸を連続的に機器内で -20℃ に冷却し、析出した液を採取した。サイトカインまたはケモカイン濃度は、ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) または Bio-plex assay kits (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) を用いて測定し、各群で比較した。

(2) IFN 群の血管内皮細胞を介した好酸球接着に対する影響

好酸球は、以前に報告した方法に従い、健常人末梢血より分離した。はじめに、ヘパリン処理した末梢血を、1.090 g/ml Percoll を用いて比重遠心分離を行った。血漿、単核球バンド、Percoll を除去し、ペレットを蒸留水による溶血処理を行い、残存する顆粒球から、抗 CD16 抗体 beads を用いた negative selection で分離した。好酸球の分離純度は 98% 以上であり、viability は 99% 以上であった。血管内皮細胞は、ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用い、一部は IFN 群や TNF- α などで刺激した。

好酸球の接着は以前に報告した方法に従って、残存 eosinophil peroxidase (EPO) 法を用いて検討した。HUVEC で coat した 96 well-plate を用い、はじめに 0.1% gelatin 含有 HBSS で非特異反応をブロックした。その後、好酸球を well に加え、37 $^{\circ}$ C 20 分 incubate した。HBSS で wash した後、 o -phenylenediamine (OPD) を加え、反応させ、490 nm の吸光度を測定した。細胞数既知の好酸球に対する反応と比較することで、好酸球の plate への接着を評価した。

(3) 2 刺激薬の末梢血単核球からのサイトカイン産生に与える影響

末梢血単核球は、健常人 ダニ陽性喘息患者より分離した。はじめにヘパリン処理した末梢血を、Ficoll-plus を用いて比重遠心分離を行った。中間層を他に移したのちに、遠心及び洗浄し、末梢血単核球として使用した。末梢血単核球を、0.1-1M salbutamol で 24 時間 pre-incubation したのち、ionomycin (300 nM) + PMA (5 nM) またはダニ抗原 (1 μ g/ml: ダニ陽性喘息患者のみ) で 72 時間刺激し、上清中の IL-13 と IFN- γ 濃度を ELISA で測定した

(4) CXCR3 ligands の好酸球機能に与える影響
好酸球の接着は、rh-VCAM-1 または rh-ICAM-1 で pre-coat した 96 well-plate を用い、残存 EPO 法をもちいて検討した。また活性酸素測定は、以前に報告した方法に従って、チトクローム C 還元法を用いて検討した。はじめに、コントロール well に superoxide dismutase (SOD; 0.2 mg/mL in HBSS/gel) を 20 μ l ずつ加え、各 well に刺激物を入れたのち 100 μ l となるよう HBSS/gel を加えた。好酸球浮遊液とチトクローム C (12 mg/ml) を体積比 4 対 1 で混合し、これを各 well に 100 μ l ずつ加えた。550 nm の吸光度を経時的に測定し、SOD を含んだ反応と比較した。活性酸素産生量は分子吸光度計数 21.1×10^3 M/L $^{-1}$ cm $^{-1}$ から、nmoles cytochrome C reduced/10 6 cells \cdot SOD control として算出した。

4. 研究成果

(1) 誘発喀痰・呼気凝縮液の解析

はじめに誘発喀痰を用いて、重症喘息で発現亢進しているサイトカイン・ケモカインの同定を試みた。好中球遊走因子である CXC ケモカイン (IL-8, GRO- α , ENA78) の中で、IL-8 が重症喘息患者の喀痰上清で発現亢進していた。一方で GRO- α , ENA78 は増加していなかった。さらに好酸球遊走活性を有する Eotaxin は重症喘息患者で有意に抑制されていた。

また吸入ステロイド中止前後での検討では、誘発喀痰中の IL-8、TNF- α 濃度、好中球比率は不変であったが、代表的 Th2 サイトカインである IL-4 濃度は吸入ステロイド中止に伴い増加し、喀痰中好酸球比率の増加と連動した。この結果は、吸入ステロイドは、基本的に Th2 サイトカインによる気道炎症を沈静しているが、自然免疫系炎症分子、そして好中球炎症の制御に成功していないことを示唆する。またこの成績は、重症喘息喀痰で IL-8、TNF- α 濃度、好中球比率が増加しているという我々の検討成績と符合しており、治療反応性の観点から喘息難治化におけるこれらの寄与を示唆すると考えられる

我々は以前に、IL-8 刺激好中球が、好酸球刺激因子がなくても、好酸球の基底膜通過遊走反応を能動的に調節することを報告しており、重症患者における喘息治療・管理向上のためには、従前の吸入ステロイドに加え、IL-8 または好中球を標的とした薬物の併用療法等も考慮すべきであることが考えられた。

また呼気凝縮液ではこれらのサイトカインやケモカインは測定できなかったが、TXB2 や LTB4 など脂質メディエータは検出可能であったため、重症度におけるこれらの発現の差異について検討した。重症喘息での呼気凝縮液では、TXB2 の発現が亢進していた。またコントロール不良群において TXB2 及び LTB4 の発現が亢進していた。TXB2 や LTB4 は、重症喘息またはコントロール不良喘息における有用なマーカーとなる可能性が示唆された。

(2) IFN 群の血管内皮細胞を介した好酸球接着に対する影響

IFN 群 (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) は、他の内皮細胞活性化因子である TNF- α と同時に、血管内皮細胞を刺激すると、その血管内皮細胞においては、好酸球の接着誘導能力が有意に増強することを観察した。この好酸球接着の増強には、主として血管内皮細胞も VCAM-1 あるいは ICAM-1 などの接着分子群の発現増強が寄与することが確認され、重症喘息で見られる好酸組織浸潤メカニズムの一つであることが想定された。また IFN 群が直接好酸球を活性化させることはなかった。

(3) 2 刺激薬の末梢血単核球からのサイトカイン産生に与える影響

代表的吸入 2 刺激薬である salbutamol は、喘息患者無刺激あるいはダニ抗原刺激単核球からの IL-13 産生を亢進させ、逆に喘息患者無刺激あるいは PMA/ionomycin 刺激単核球からの IFN- γ 産生を抑制した。また salbutamol は、喘息患者ダニ抗原刺激単核球からの RANTES 産生を亢進させた。このことは過剰な 2 刺激薬使用が喘息気道での Th1/Th2 インバランスを助長し、気道炎症を難治化させる可能性を示唆した。

(4) CXCR3 ligands の好酸球機能に与える影響
IP-10, Mig, I-TAC は、好酸球の ICAM-1 に対する接着反応を有意に亢進させ、また ICAM-1 存在下で活性酸素産生を有意に亢進させた。気道における IP-10 などの CXCR3 ligands 発現はステロイドで抑制されづらい事が知られており、この機序が重症喘息において好酸球性気道炎症が残存する一つの原因である可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Takaku Y, Nakagome K, Kobayashi T, Yamaguchi T, Nishihara F, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Changes in airway inflammation and hyperresponsiveness after inhaled corticosteroid cessation in allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 S(1):41-46. 査読有
2. Yamaguchi T, Soma T, Takaku Y, Nakagome K, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Salbutamol modulates the balance of Th1 and Th2 cytokines by mononuclear cells from allergic asthmatics. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152 S(1):32-40. 査読有
3. Kikuchi S, Kikuchi I, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Neutrophilic inflammation and CXC chemokines in patients with refractory asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149 S(1):87-93. 査読有
4. Mori M, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Eosinophil superoxide anion generation induced by adhesion molecules and leukotriene D4. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149 S(1):31-38. 査読有
5. Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M, Nagata M. Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *Eur Respir J*. 2008;32:1540-1547. 査読有

6. Soma T, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Uematsu K, Nagata M. Inhibitory effect of budesonide alone and in combination with formoterol on IL-5 and RANTES production from mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146 S(1):22-27. 査読有

〔学会発表〕(計 36 件)

1. Nishihara. Effect of Omalizumab in Japanese severe allergic asthma and rhinitis. WAO International Scientific Conference, 6th Dec 2010, UAE.
2. 永田真. 細胞生物学からみた ICS/LABA 配合剤. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会教育セミナー1. 2010 年 11 月 25 日東京都.
3. 中込一之. OVA 惹起好中球性気道炎症モデルにおける, ドーパミン D1 受容体拮抗薬の抑制効果. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010 年 11 月 25 日東京都.
4. 中込一之. 急性好酸球性肺炎の気管支肺胞洗浄液におけるサイトカイン・ケモカイン濃度の解析. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010 年 11 月 25 日東京都.
5. 高久洋太郎. 成人重症喘息患者における好中球性気道炎症に対する喘息教育効果の検討. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010 年 11 月 25 日東京都.
6. 高久洋太郎. 気管支喘息患者における吸入ステロイド中止の好中球性炎症関連分子への影響. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010 年 11 月 25 日東京都.
7. 西原冬実. ロイコトリエン受容体拮抗薬の単核球サイトカイン産生に及ぼす影響. 第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2010 年 11 月 25 日東京都.
8. Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. Symposium 10: Immunology of Allergy and Asthma. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, 7th Nov. 2010, Singapore
9. Nishihara F. Effect of Omalizumab in Japanese severe allergic asthma. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, 7th Nov 2010, Singapore.
10. Yamaguchi T. Salbutamol modulates the balance of Th1 and Th2 cytokines by mononuclear cells from allergic asthmatics. The 8th Asia Pacific Congress of Allergy, Asthma and Clinical Immunology, 7th Nov 2010, Singapore.
11. 永田真. 喘息長期管理の今後の課題. 第 20 回国際喘息学会日本北アジア部会モーニングセミナー. 2010 年 7 月 3 日東京都.

12. 高久洋太郎．低用量吸入ステロイドによりコントロールされた成人喘息患者における治療中止の検討 第20回国際喘息学会日本北アジア部会 2010年7月2日東京
13. 西原冬実．埼玉医大アレルギーセンターにおける抗IgE抗体療法導入8症例の臨床的検討．第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月8日京都
14. 高久洋太郎．成人喘息患者の気道炎症に対する喘息教育効果の検討．第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 2010年5月8日京都
15. 山口剛史．気管支喘息における炎症性サイトカイン産生に及ぼすサルブタモールの影響 第50回日本呼吸器学会 2010年4月24日京都
16. 永田真．喘息：長時間作用型 2刺激薬．第50回日本呼吸器学会シンポジウム 大規模臨床試験より見えること．2010年4月24日東京都
17. 高久洋太郎．ダニ・アレルギー患者由来単核球における好中球性炎症関連分子の検討．第50回日本呼吸器学会 2010年4月23日京都
18. 永田真，柚知行．好中球性炎症の関与．第50回日本呼吸器学会シンポジウム 気管支喘息の病態の新知見 2010年4月23日東京都
19. Takaku Y. Changes in airway inflammation and hyperresponsiveness following cessation of inhaled corticosteroid in asthma. American Academy of Allergy Asthma & Immunology 2010 Annual Meeting. 1st Mar 2010, New Orleans.
20. Soma T. Theophylline attenuates eosinophil adhesion to Interferon IFN-gamma-stimulated endothelial cells. American Academy of Allergy Asthma & Immunology 2010 Annual Meeting. 1st Mar 2010, New Orleans.
21. Yamaguchi T. Effects of 2-agonist on the Productions of Th1 and Th2 Cytokines by Mononuclear Cells from Patients with Asthma. The XXI World Allergy Congress, 8th Dec 2009, Buenos Aires.
22. Takaku Y. CXCR3 ligands upregulate the effector functions of eosinophils. The XXI World Allergy Congress, 7th Dec 2009, Buenos Aires.
23. 永田真．第59回日本アレルギー学会学術大会イブニングシンポジウム：重症気管支喘息への取り組み。「重症喘息の炎症病態」 2009年10月30日秋田市
24. 高久洋太郎．気管支喘息患者における呼気凝縮液中エイコサノイドの検討．第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月30日秋田市
25. 高久洋太郎．寛解した気管支喘息患者におけるTh1/Th2インバランスからみた吸入ステロイド中止後の病状推移の検討．第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月30日秋田市
26. 高久洋太郎．ダニ・アレルギー患者由来単核球における好中球性炎症関連分子の検討．第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2009年10月29日秋田市
27. 山口剛史．サルブタモールのアレルギー性気道炎症におけるTh1/Th2サイトカイン産生への効果．第19回国際喘息学会日本北アジア部会．2009年7月10日東京．
28. 高久洋太郎．CXCR3リガンドは好酸球の接着反応と活性酸素産生を誘導する．第19回国際喘息学会日本北アジア部会．2009年7月10日東京．
29. 高久洋太郎．喘息における吸入ステロイド中止可能症例の臨床的検討．第50回日本呼吸器学会学術講演会．2009年6月14日東京都
30. 中込一之．新しい喘息治療のアプローチ．第49回日本呼吸器学会学術講演会教育イブニングシンポジウム「喘息治療に残された課題は？」．2009年6月13日東京都
31. 柚知行．IFN- γ による血管内皮細胞の好酸球接着増強に及ぼすテオフィリンの効果．第50回日本呼吸器学会学術講演会．2009年6月13日東京都
32. 高久洋太郎．気管支喘息患者における呼気凝縮液中エイコサノイドの検討．第50回日本呼吸器学会学術講演会．2009年6月12日東京都
33. 永田真．制御性T細胞と免疫・アレルギー疾患．第49回日本呼吸器学会学術講演会教育講演1．2009年6月12日東京都
34. 永田真．米国ガイドラインEPR3の喘息管理の考え方．第49回日本呼吸器学会学術講演会ランチョンセミナー2．2009年6月12日東京都
35. 永田真．Conの立場から．第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 Pro Con 「吸入ステロイドは喘息の進行を抑えるか」．2009年6月5日岐阜市
36. 永田真．アレルギー免疫療法の進歩と展望．第21回日本アレルギー学会春季臨床大会シンポジウム「アレルギーの免疫療法と抗体療法」．2009年6月4日岐阜市

6．研究組織

(1)研究代表者

永田 真 (NAGATA MAKOTO)
 埼玉医科大学・医学部・教授
 研究者番号：20211443